

51

Int. Cl.:

C 12 d, 13/06

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

DEUTSCHES PATENTAMT



52

Deutsche Kl.: 6 a, 22/10

10

11

21

22

43

Offenlegungsschrift 2137 043

Aktenzeichen: P 21 37 043.4

Anmeldetag: 24. Juli 1971

Offenlegungstag: 3. Februar 1972

Ausstellungspriorität: —

30

Unionspriorität

32

Datum: 28. Juli 1970

33

Land: Großbritannien

31

Aktenzeichen: 36563-70

54

Bezeichnung: Neues Enzympräparat und Verfahren zu seiner Herstellung

61

Zusatz zu: —

62

Ausscheidung aus: —

71

Anmelder: Novo Terapeutisk Laboratorium A/S, Kopenhagen

Vertreter gem. § 16 PatG: Louis, D., Dr.; Pöhlau, C., Dipl.-Phys.; Lohrentz, F., Dipl.-Ing.;
Patentanwälte, 8500 Nürnberg und 8130 Starnberg

72

Als Erfinder benannt: Nielsen, Tage Kjaer, Herlev; Markussen, Erik Kjaer,
Vaerloese (Dänemark)

BEST AVAILABLE COPY

DT 2137 043

Dr. rer. for. 1911
Dipl.-Ing. 1912
Dr. rer. 1913
8500 110 0111 11 11
KESSELER LANGE

2137043

12.181/10-kü

Novo Terapeutisk Laboratorium A/S, Kopenhagen (Dänemark)

Neues Enzympräparat
und Verfahren zu seiner Herstellung.

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Herstellung von Enzympräparaten, die feste Kügelchen von im wesentlichen einheitlicher Größe enthalten.

In der vorliegenden Beschreibung und in den Ansprüchen sollen unter dem Ausdruck "Pellets" nicht nur normale Pellets verstanden werden, sondern auch extrudierte (stranggepreßte), geformte Körper, die eine längliche Struktur, beispielsweise eine spaghettiartige Struktur besitzen.

Es ist bekannt, ein extrudiertes Material dadurch in feste Kügelchen von einheitlicher Größe zu überführen, daß die extrudierten Pellets in einen Behälter mit stationären festen Seitenwänden und einer* drehbar gelagerten Reibplatte gebracht werden, die mit einer Geschwindigkeit bis zu 1.800 u/min rotiert. Die Spheronisierung wird durch die Zentrifugalkraft und die Reibung bewirkt und kann in Maschinen durchgeführt werden, die unter dem Markennamen MARUMERIZER[®] auf dem Markt sind.

Es wurde nun gefunden, daß die Spheronisierung im Zusammenhang mit Enzympräparaten von Nutzen ist, insbesondere solchen, die in der sich mit der Herstellung von Detergenzien befassenden Industrie verwendet werden, beispielsweise bei Präparaten, welche Enzyme und Additive enthalten, die im allgemeinen in Waschmittel- und Reinigungsmittelzusammensetzungen eingesetzt werden, wobei dann das Verfahren mit gewissen extrudierten enzymhaltigen Pellets durchgeführt wird. Diese Pellets werden in an sich bekannter Weise aus einer Mischung eines ein Enzym enthaltenden Pulvers mit einer oder mehreren Substanzen erhalten, welche die folgenden spezifischen Eigenschaften besitzen:

* bodenseitig

109886/1302

- 1) Der Schmelzpunkt soll zwischen 30° und 100°C , vorzugsweise zwischen 40° und 60°C liegen
- 2) Die Substanz soll zäh und nicht spröde sein, und
- 3) Die Substanz soll bei Raum(umgebungs)temperaturen eine gewisse Plastizität besitzen.

Zu den Substanzen, welche diese Eigenschaften besitzen, gehören beispielsweise: Wachse bzw. wachsartige Substanzen, Polyglykole, Fettalkohole, äthoxylierte Fettalkohole, höhere Fettsäuren, Mono-, Di- und Triglycerolester der höheren Fettsäuren, Kohlenwasserstoffe und Alkylaryläthoxylate.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren wird demzufolge so vorgegangen, daß enzymhaltige Pellets, die durch Extrudieren einer Mischung aus 3 bis 95 % eines festen enzymhaltigen Pulvers, das gegebenenfalls einen Enzymstabilisator enthält, und 97 bis 5 % von einer oder mehreren Substanzen mit den oben unter 1) bis 3) angegebenen Eigenschaften erhalten werden, einer Spheronisierung unterworfen werden, wobei eine Rotationsgeschwindigkeit bis zu 2.000 u/min in einer Apparatur Anwendung findet, in der Zentrifugal- und Reibungskräfte auf die Pellets zur Einwirkung gebracht werden.

Die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren erhältlichen Enzympräparate bestehen aus Partikel von praktisch einheitlicher Größe, die für eine industrielle Verwendung geeignet sind. Die Partikel sind im wesentlichen staubfrei und besitzen eine ausreichende mechanische Festigkeit, um ohne Bildung von Staub(abrieb) gehandhabt werden zu können. Die Partikel besitzen weiterhin zufriedenstellende Fließeigenschaften für den Transport in Fabriken.

In den nachfolgenden Beispielen werden Rotationsgeschwindigkeiten von bis zu 800 bis 900 u/min während der Spheronisierung angewendet; jedoch können auch Geschwindigkeiten bis etwa 2.000 u/min Anwendung finden.

Bei einer vorzugsweisen Ausführungsform der Erfindung wird die Spheronisierung in einer Maschine desjenigen Typs durchgeführt, der unter der Warenbezeichnung MARUMERIZER[®] auf dem Markt ist.

Das Enzympulver enthält neben dem eigentlichen Enzym vorzugsweise geeignete Additive, wie beispielsweise Enzymstabilisatoren, Füllstoffe, usw..Gelatine, Kasein und andere Substanzen, die als Substrate für die Enzyme wirken, seien als Enzymstabilisatoren genannt. Beispiele für Füllstoffe sind anorganische Salze, wie Natriumchlorid, Natriumtripolyphosphat, Tetrakaliumpyrophosphat, sowie Natriumsulfat, Cellulosepulver, Stärkepulver, Cellulosederivate, Stärkederivate oder Abbauprodukte der Stärke und wasserlösliche Silikate.

Die Extrusion wird vorzugsweise bei Temperaturen in der Nähe des Erweichungspunktes der dem Enzympulver zugesetzten Verbindungen durchgeführt. Falls der Schmelzpunkt dieser Verbindungen zwischen 30° und 40°C liegt, hat das extrudierte Produkt im allgemeinen die Neigung, etwas klebrig zu werden. Schmelzpunkte oberhalb 60°C erfordern eine Vorwärmung der zu extrudierenden Mischung.

Das Verhältnis zwischen dem Enzympulver und den zugesetzten Komponenten hängt von der Enzymaktivität des Enzympulvers und der gewünschten enzymatischen Aktivität in dem spheronisierten Endprodukt ab.

Um zu vermeiden, daß die spheronisierten Partikel zusammenhängen, kann eine Pulverisierung mit beispielsweise anorganischen Salzen oder Oxiden, wie Titandioxid, Anwendung finden. Mit den nachfolgenden Beispielen soll das erfindungsgemäße Verfahren verdeutlicht werden. In diesen Beispielen wird ein Enzymkonzentrat verwendet, das unter dem Markennamen ALCALASE[®] auf dem Markt ist und ein proteolytisches Enzym zusammen mit einigen inaktiven organischen Substanzen und anorganischen Salzen, hauptsächlich Natriumsulfat, enthält. Bei einem Beispiel wird eine fungale α -Amylase eingesetzt.

Bei dem vorliegenden Verfahren können aber auch andere Enzyme eingesetzt werden, beispielsweise proteolytische Enzyme, die auf dem in der Deutschen Patentanmeldung P 1800508.8-41 beschriebenen Weg durch aerobe Kultivierung von proteasebildenden Arten der Gattung Bazillus auf einem Nährmedium mit einem pH im Bereich von 9 bis 11 und unter Aufrechterhaltung eines pH in diesem Medium während der Hauptzeit der Kultivierung zwischen 7,5 und 10,5 erzeugt werden, wobei diese proteolytischen Enzyme eine proteolytische Aktivität von 80 bis 100 % der maximalen Aktivität bei Bestimmung bei einem pH 12 nach der Anson Hämoglobinemethode in Gegenwart von Harnstoff zeigen.

Beispiele für solche Enzyme, die mit Erfolg bei dem erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt werden können, sind die vorerwähnten Proteinasen und Amylasen und ebenfalls die Lipasen, die milchkoagulierenden Enzyme, die Cellulasen und Hemicellulasen, die Glucoseisomerasen, Amyloglucosidasen und Pectinasen.

Die vorerwähnte Spheronisierung kann unter Verwendung eines Materials durchgeführt werden, das in einem axial- oder in einem peripherischarbeitenden Extruder hergestellt wurde. In Fällen, in denen das Endprodukt ein niedriges Schüttgewicht hat, wird jedoch ein peripherischarbeitender Extruder bevorzugt, in welchem die extrudierte Masse einem verhältnismäßig niedrigen Extrusionsdruck ausgesetzt und demnach auch verhältnismäßig wenig komprimiert wird.

Insbesondere für Detergenzien besteht die Möglichkeit ein sprühgekühltes oder pelletiertes Produkt dadurch zu erhalten, daß eine Schmelze von Polyäthylenglycol oder nicht-ionischen oberflächenaktiven Substanz mit einem suspendierten Enzym in einem Turm versprüht wird, durch den ein kalter Luftstrom geführt wird, wodurch die versprühte Schmelze bei der Verfestigung in kleine Kügelchen oder dergleichen gebracht wird. Es ist ein Nachteil dieser Arbeitsweise, daß kostspielige Apparaturen benötigt und

eine verhältnismäßig große Menge an Wachs bzw. wachsartigen Substanzen (etwa 50 %) eingesetzt werden. Bei dem Verfahren nach der vorliegenden Erfindung ist die Menge an Wachs bzw. wachsartiger Substanz, die zur Herstellung eines stabilen Granulats erforderlich ist, wesentlich geringer. Während ein sprühgeköhltes Produkt nur im Korn durchgehend eingefärbt werden kann, läßt sich das erfindungsgemäße Produkt während oder nach der Spheronisierung lediglich in der Oberfläche einfärben.

In den Beispielen sind die Prozentsätze in Gewichtsprozent angegeben.

Beispiel 1

Es wird eine Anteigung folgender Zusammensetzung hergestellt:

12 %	ALCALASE (R)
67 %	Natriumchlorid
21 %	NONIPOL CS-50

NONIPOL CS-50 stellt ein Fettalkohol mit 16 bis 18 C-Atomen dar, der mit 50 Mol Äthylenoxid äthoxyliert ist.

Die Anteigung wird in an sich bekannter Weise durch ein 0,7 mm Sieb extrudiert. Durch die Friktion in der Extrusionsvorrichtung wird die Mischung auf eine Temperatur um 40°C erhitzt, so daß sie plastisch wird. Nach Austritt aus dem Extruder wird durch das extrudierte Produkt sofort kalte Luft geblasen, um ein Zusammenhaften der Pellets zu vermeiden. Hiernach werden diese auf ein Vibrationssieb gebracht, um diejenigen Pellets abzutrennen, die einen Durchmesser von mehr als 3 mm besitzen. Die restlichen Pellets werden dann spheronisiert in einem MARUMERIZER (R), zu Beginn mit einer Geschwindigkeit von 400 u/min unter Pulverisierung mit Titandioxid und anschließend mit einer Geschwindigkeit von 800 u/min. Irgendwelche Spuren von Staub können von der pulverisierten Substanz durch Absieben abgesondert werden.

Das Endprodukt hat folgende Eigenschaften:

Proteolytische Aktivität	0,48 Anson Einheiten/g
Partikelgröße	0,7 mm
Schüttgewicht	etwa 1,0 g/cm ³

Das Produkt ist staubfrei und in wässrigen Medien löslich. Die Anson Methode zur Messung der proteolytischen Aktivität ist in J. Gen. Physiol., 22, 79-89 (1938) beschrieben.

Beispiel 2

Es wird eine Anteigung folgender Zusammensetzung hergestellt:

30 %	ALCALASE [®]
10 %	Polyäthylenglycol 6000 (Schmelzpunkt 63°C)
60 %	Natriumtripolyphosphate (Marcon TypeD)

Die Mischung wurde wie in Beispiel 1 extrudiert mit der Maßgabe, daß sie mit 2 % Wasser angefeuchtet wurde, um die Extrusion zu ermöglichen. Das extrudierte Produkt wurde dann, wie in Beispiel 1 beschrieben, spheronisiert.

Das Endprodukt besaß folgende Eigenschaften:

Proteolytische Aktivität	1,3 Anson Einheiten/g
Partikelgröße	0,7 mm
Schüttgewicht	etwa 1,0 g/cm ³

Das Produkt ist in wässrigen Medien löslich.

Beispiel 3

Es wurde eine Anteigung folgender Zusammensetzung hergestellt:

80 %	Fungale α -Amylase
20 %	Polyäthylenglycol 2000

Die Mischung wurde mit 13 % Polyäthylenglycol 600 als Schmiermittel versetzt.

Die geschmierte Mischung wurde durch ein 0,9 mm Sieb extrudiert und bei einer Geschwindigkeit von 900 u/min spheronisiert.

3 % wasserfreies Natriumsulfat wurden während der Spheronisierung zugesetzt, um ein Verklumpen im MARUMERIZER[®] zu vermeiden.

Um das Endprodukt nicht-klebrig zu halten, wurden 0,25 % AEROSIL[®] zugemischt. Bei AEROSIL[®] handelt es sich um hochdisperses Siliziumdioxid mit einer Partikelgröße von ca. 10 μ .

Eigenschaften des Produktes:

Enzymatische Aktivität	2000 FAU/g
Partikelgröße	0,8 - 0,9 μ m
Schüttgewicht	0,9 g/cm ³

Die α -Amylase Aktivität (FAU/g) wird nach Cereal Chem., 16, 712 (1939) gemessen, wobei allerdings die Methode so modifiziert ist, daß die folgende Gleichung für die Berechnung verwendet werden kann:

$$1000\text{SKB Einheiten (pH 4,7)} = 37 \text{ FAU}$$

für fungale α -Amylase

Beispiel 4

Eine Mischung folgender Zusammensetzung:

10.0 %	ALCALASE [®]
17.0 %	Polyäthylenglycol 2000
3.5 %	Polyäthylenglycol 600
69.5 %	Natriumchlorid

wurde mit 1 % Wasser angefeuchtet, durch ein 0,8 mm Sieb extrudiert und wie in Beispiel 1 spheronisiert.

Das Endprodukt besaß folgende Eigenschaften:

Proteolytische Aktivität	0,5 AU/g
Partikelgröße	etwa 0,8 mm
Schüttgewicht	etwa 1,0 g/cm ³

Beispiel 5

Eine Anteigung folgender Zusammensetzung:

ALCALASE [®]	58 %
Polyäthylenglycol 2000	17 %
Polyäthylenglycol 600	3 %
Natriumchlorid	22 %

wurde wie in Beispiel 1 extrudiert, mit der Ausnahme, daß die Befeuchtung mit 2 % Wasser vorgenommen wurde, um die Extrusion zu ermöglichen. Das Extrudat wurde spheronisiert bei 900 u/min.

Das Endprodukt besaß folgende Eigenschaften:

Proteolytische Aktivität	6,0 AU/g
Partikelgröße	0,7 mm
Schüttgewicht	etwa 1,0 g/cm ³

2137043

9

eingegangen am 22.11.71
für die ursprünglichen Ansprüche
1-9. N. H.
22.9.71. 12 181 10/Ko

P 21 37 043.4

Neue Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung von Enzympräparaten aus festen Kügelchen, die eine im wesentlichen einheitliche Grösse besitzen, dadurch gekennzeichnet, dass enzymhaltige Pellets, die durch Extrusion einer Mischung aus 3 bis 95% festem enzymhaltigem Pulver, das gegebenenfalls einen Enzymstabilisator enthält, und 97 bis 5% von einer oder mehreren Verbindungen, die einen Schmelzpunkt zwischen 30° und 100°C, vorzugsweise zwischen 40° und 60°C aufweisen, zäh und nicht spröde sind und bei Raumtemperaturen plastisch sind, hergestellt wurden, einer Spheronisierung bei Anwendung von Rotationsgeschwindigkeiten bis zu 2000 u/min in einer Apparatur unterworfen werden, um die Pellets der Einwirkung von Zentrifugal- und Reibungskräften auszusetzen.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Spheronisierung unter Verwendung eines die Pulverbildung fördernden Mittels durchgeführt wird,

109886/1302

um eine Adhäsion zwischen den spheronisierten Partikeln zu vermeiden.

3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass als die Pulverbildung förderndes Mittel ein anorganisches Salz verwendet wird.
4. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass als die Pulverbildung förderndes Mittel ein anorganisches Oxid verwendet wird.
5. Verfahren nach einem oder beiden der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Spheronisierung in einer Zentrifuge mit stationären Seitenwänden und einer als Boden dienenden Friktionsplatte durchgeführt wird.
6. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass dem festen Enzympulver als Stabilisator Gelatine oder Kasein oder eine andere als Enzymsubstrat wirkende Substanz beigegeben wird.
7. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass als Sub-

stanzen, welche die in Anspruch 1 bezeichneten Eigenschaften aufweisen, Wachse bzw. wachsartige Substanzen und/oder Polyglycole und/oder Fettalkohole und/oder äthoxylierte Fettalkohole und/oder höhere Fettsäuren und/oder Mono-, und/oder Di- und/oder Triglycerolester von höheren Fettsäuren und/oder Kohlenwasserstoffe und/oder Alkylaryläthoxylate verwendet werden.

8. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass ein Enzympulver mit Protease und/oder Amylase und/oder Amyloglucosidase und/oder Isomerase verwendet wird.
9. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche 1 - 8, dadurch gekennzeichnet, dass ein Enzympulver mit Bakterienproteinasen, fungaler α -Amylase und/oder proteolytischen Enzymen verwendet wird, die durch aerobe Kultivierung von proteasebildenden Arten der Gattung *Bacillus* auf einem Nährmedium mit einem pH zwischen 9 und 11 und Aufrechterhaltung eines pH in diesem Medium zwischen 7,5 und 10,5 während der Hauptperiode der Kultivierung erzeugt wurden, wobei die proteolytischen Enzyme eine proteolytische Aktivität zwischen 80 und 100 % der maximalen

Aktivität bei Bestimmung bei einem pH von 12 durch
die Anson Hämoglobin-Methode in Gegenwart von Harn-
stoff besitzen.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record.**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.